

(11)Publication number : 2000-189105
(43)Date of publication of application : 11.07.2000

(51)Int.Cl.

A23L	1/30
A23C	9/123
A23L	1/307
A61P	3/06
A61K	35/74
C12N	1/20

(21)Application number : 10-369597	(71)Applicant : TAKANASHI MILK PRODUCTS CO LTD
(22)Date of filing : 25.12.1998	(72)Inventor : KAWASE MANABU HOSODA MASATAKA HASHIMOTO HIDEO

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a functional food or drink effective for decreasing the total cholesterol level and increasing the HDL-cholesterol in serum by including a cultured product produced by culturing a specific lactobacillus in a specific culture base containing a whey protein and keeping the ratio of the whey protein in the milk protein to a level exceeding a prescribed level.

SOLUTION: The objective food contains (A) a cultured product produced by culturing a culture base containing whey protein with a lactobacillus which is a secondary bile acid non-producing strain belonging to lactobacillus survivable in intestine such as Lactobacillus casei TMC0409 strain (FERM P-17047) and (B) a cultured product produced by culturing a culture base containing whey protein with a lactobacillus belonging to Streptococcus thermophilus such as Streptococcus thermophilus TMC1543 Strain (FERM P-17046) and the ratio of the whey protein in the milk protein exceeds 21 wt.%. Preferably, the components A and B are cultured products produced by the culture of the same culture base.

[Date of request for examination]	17.10.2005
[Date of sending the examiner's decision of rejection]	
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]	
[Date of final disposal for application]	
[Patent number]	
[Date of registration]	
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]	
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]	
[Date of extinction of right]	

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-189105
(P2000-189105A)

(43) 公開日 平成12年7月11日 (2000.7.11)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	Z 4 B 0 0 1
A 2 3 C 9/123		A 2 3 C 9/123	4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/307		A 2 3 L 1/307	4 B 0 6 5
A 6 1 P 3/06		A 6 1 K 31/00	6 0 3 L 4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/74		35/74	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-369597

(22) 出願日 平成10年12月25日 (1998. 12. 25)

(71) 出願人 591152584

高梨乳業株式会社

神奈川県横浜市旭区本宿町5番地

(72) 発明者 川瀬 学

高梨乳業株式会社商品研究所内

(72) 発明者 細田 正孝

高梨乳業株式会社商品研究所内

(72) 発明者 橋本 英夫

高梨乳業株式会社商品研究所内

(74) 代理人 100097928

弁理士 岡田 数彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血清脂質改善効果を有する機能性飲食品

(57) 【要約】

【課題】 血清中の総コレステロールの低減とHDL-コレステロールの増加およびトリグリセライドの低減を図った機能性飲食品であって、乳清蛋白質を含有し且つ他の成分により乳清蛋白質の効果を高めることにより、乳清蛋白質の適用量を軽減し得る様に改善された上記の機能性飲食品を提供する。

【解決手段】 腸内生存性ラクトバチルス (*Lactobacillus* sp.) に属する乳酸菌で乳清蛋白質を含有する培養基を培養した培養物 (a)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) に属する乳酸菌で乳清蛋白質を含有する培養基を培養した培養物 (b) を含有し、乳蛋白質中の乳清蛋白質の割合が21重量%を超える割合である機能性飲食品。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 腸内生存性ラクトバチルス (*Lactobacillus* sp.) に属する乳酸菌で乳清蛋白質を含有する培養基を培養した培養物 (a)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) に属する乳酸菌で乳清蛋白質を含有する培養基を培養した培養物 (b) を含有し、乳蛋白質中の乳清蛋白質の割合が21重量%を超える割合であることを特徴とする血清脂質改善効果を有する機能性飲食品。

【請求項2】 培養物 (a) 及び培養物 (b) が同一の培養基を培養した培養物である請求項1に記載の機能性飲食品。

【請求項3】 培養物 (a) 及び培養物 (b) が各別に準備された培養基を培養した後に混合された培養物である請求項1に記載の機能性飲食品。

【請求項4】 腸内生存性ラクトバチルスに属する乳酸菌が二次胆汁酸非生産菌である請求項1～3の何れかに記載の機能性飲食品。

【請求項5】 腸内生存性ラクトバチルスに属する乳酸菌がラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) である請求項1～4の何れかに記載の機能性飲食品。

【請求項6】 ラクトバチルス・カゼイがラクトバチルス・カゼイ TMC0409株 (FERM P-17047) である請求項5に記載の機能性飲食品。

【請求項7】 ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) に属する乳酸菌が粘質物生産菌である請求項1～6の何れかに記載の機能性飲食品

【請求項8】 ストレプトコッカス・サーモフィラスに属する乳酸菌がストレプトコッカス・サーモフィラス TMC1543株 (FERM P-17046) である請求項1～7の何れかに記載の機能性飲食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、血清脂質改善効果を有する機能性飲食品に関するものである。本発明において、血清脂質改善とは、血清中の総コレステロールの低減とHDL-コレステロールの増加およびトリグリセライドの低減を意味する。

【0002】 一般に血清中のコレステロールの増加は動脈硬化の原因となることが知られており、その低減物質に関しては各種の提案がなされている。例えば、特開平5-344864号公報や特開平6-165655号公報においては、乳清蛋白質 (ホエイ蛋白質) やその誘導体について提案されている。また、特開昭62-258323号公報、特開平5-65229号公報、特開平7-250670号公報においては、ある種の乳酸菌の培養物または菌体について提案されている。従って、乳清蛋白質の他、効力レベルは低いものの、乳酸菌またはその培養物によっても血清中の総コレステロールを低減し

得る。そして、斯かるコレステロール低減剤を飲食品に含有させた機能性飲食品も公知である。

【0003】 ところで、例えば、乳清蛋白質を配合した飲食品によって血清中の総コレステロールの低減を図らんとする場合、多量の乳清蛋白質の配合はアレルギー反応を惹起する恐れがあるために注意を要する。また、多量に乳清蛋白質を配合した飲食品は独特の好ましくない風味を有する。従って、乳清蛋白質による血清中の総コレステロールの低減剤においては、その効果を高めるための改良が切望されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、上記実情に鑑みなされたものであり、その目的は、血清中の総コレステロールの低減とHDL-コレステロールの増加およびトリグリセライドの低減を図った機能性飲食品であって、乳清蛋白質を含有し且つ他の成分により乳清蛋白質の効果を高めることにより、乳清蛋白質の適用量を軽減し得る様に改善された上記の機能性飲食品を提供することにある。

【0005】 本発明者らは、上記の目的を達成すべく鋭意検討を重ねた結果、次の様な新規な知見を得た。すなわち、血清中の総コレステロールの低減効果が必ずしも高くないレベルのある種の乳酸菌で乳清蛋白質を含有する培養基を培養するならば、意外にも、乳清蛋白質の総コレステロールの低減効果が顕著に高められ、しかも、HDL-コレステロールの増加効果が発現される。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明は、上記の知見に基づき完成されたものであり、その要旨は、腸内生存性ラクトバチルス (*Lactobacillus* sp.) に属する乳酸菌で乳清蛋白質を含有する培養基を培養した培養物 (a)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) に属する乳酸菌で乳清蛋白質を含有する培養基を培養した培養物 (b) を含有し、乳蛋白質中の乳清蛋白質の割合が21重量%を超える割合であることを特徴とする血清脂質改善効果を有する機能性飲食品に存する。

【0007】

【発明の実施の形態】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明に係る機能性飲食品は、腸内生存性ラクトバチルス (*Lactobacillus* sp.) に属する乳酸菌で乳清蛋白質を含有する培養基を培養した培養物 (a)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) に属する乳酸菌で乳清蛋白質を含有する培養基を培養した培養物 (b) を含有する。

【0008】 乳清蛋白質としては、特にその純度は限定されず、市販品をそのまま使用することが出来る。培養基は、上記の乳酸菌による乳酸発酵で変換される物質を含有し、通常、乳清蛋白質の他、カゼイン、乳糖、飲食品の種類に応じた乳酸発酵で使用される各種の成分を含

有している。

【0009】腸内生性ラクトバチルス (*Lactobacillus* sp.) に属する乳酸菌は、その胃酸耐性、胆汁酸耐性、腸細胞付着性により、特徴的な菌学的性質として腸内生性を有し、例えば、ラクトバチルス・ブルガリカスの様な腸内非生存性ラクトバチルスと明確に区別される。

【0010】腸内生性ラクトバチルスに属する乳酸菌としては、特に制限されないが、発癌抑制の観点から、二次胆汁酸非生産菌が好適に使用される。斯かる乳酸菌の好適な具体例としては、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) が挙げられ、本出願人により発見されたラクトバチルス・カゼイ TMC0409 菌株が好適に使用される。

【0011】上記の菌株は、本出願人により、東南アジアにて古くから知られている発酵乳から見出されて培養されてきた菌株である。そして、バーギーズ・マニュアル・オブ・システムチック・バクテリオロジー第2巻 (BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology Volume 2, 1986年) 第1219頁に記載のデータと対比した結果、上記の菌株は、ラクトバチルス・カゼイであると考えられ、上記の通り、ラクトバチルス・カゼイ TMC0409 株と命名した。

【0012】そして、上記の菌株は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所において、受託番号「FERM P-17047」として、平成10年11月6日から国内寄託され保管されている。

【0013】一方、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) に属する乳酸菌としては、特に制限されないが、乳清蛋白質との相乗効果を高める観点から、粘質物生産菌が好適に使用される。斯かる乳酸菌の好適な具体例としては、本出願人により発見されたストレプトコッカス・サーモフィラス TMC1543 菌株が挙げられ、当該菌株は、高粘性の粘質物を産生する特徴を有する。

【0014】上記の菌株は、本出願人により、ヨーロッパにて古くから知られている発酵乳から見出されて培養されてきた菌株である。そして、バーギーズ・マニュアル・オブ・システムチック・バクテリオロジー第2巻 (BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology Volume 2, 1986年) 第1068頁に記載のデータと対比した結果、上記の菌株は、ストレプトコッカス・サーモフィラスであると考えられ、上記の通り、ストレプトコッカス・サーモフィラス TMC1543 菌株と命名した。

【0015】そして、上記の菌株は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所において、受託番号「FERM P-17046」として、平成10年11月6日から国内寄託され保管されている。

【0016】本発明において、腸内生性ラクトバチル

スに属する乳酸菌で培養基を培養した培養物 (a) 及びストレプトコッカス・サーモフィラスに属する乳酸菌で培養基を培養した培養物 (b) は、同一の培養基を培養した培養物であっても、各別に準備された培養基を培養した後に混合された培養物であってもよいが、一般的には、同一の培養基を培養した培養物、すなわち、通常の乳酸発酵による培養物である。なお、上記の培養物とは、乳酸発酵で得られたブロス (菌体と乳酸発酵生成物の全体) を意味する。

10 【0017】本発明に係る機能性飲食品の代表例としては、乳酸菌を添加して得られる液状または固形状の発酵乳が挙げられる。一般に、発酵乳は、全乳または脱脂乳に脱脂粉乳などを加えて固形分を増やし、更に、安定剤、糖類などを添加し、乳酸菌で発酵させて製造される。本発明においては、前述の腸内生性ラクトバチルスに属する乳酸菌とストレプトコッカス・サーモフィラスに属する乳酸菌とを使用し、常法に従って発酵乳を製造する。

20 【0018】本発明の機能性飲食品において、乳蛋白質中の乳清蛋白質の割合は21重量%を超える割合でなければならない。乳清蛋白質の割合が上記未満の場合は、常識的に摂取する飲食品の量では十分な血清脂質改善効果が発現されない。上記の割合以上であれば、単独で乳清蛋白質を利用した際の血清脂質改善効果がより少ない乳清蛋白質の使用量で得られる。従って、乳清蛋白質によるアレルギーの危険率を低下させることが出来、また、乳清蛋白質独特の風味を軽減させることが出来る。乳蛋白質中の乳清蛋白質の割合は、好ましくは30~80重量%である。なお、通常、ヨーグルトにおける乳蛋白質中の乳清蛋白質の割合は21重量%以下である。従って、乳清蛋白質の割合が上記の範囲となる量の例えば乳清蛋白質濃縮物を添加する必要がある。

30 【0019】本発明において、対象となる飲食品は、液状または固形状の発酵乳に限定されず、液状または固形状の発酵乳を粉末化した健康補助食品も含む。また、サワークリーム、クリームチーズ、バター等も挙げられ、これらは何れも高脂肪食品であり、その摂取により血清中の総コレステロールを増加させる傾向を有する。従って、本発明に係る血清脂質改善効果を有する機能性飲食品の対象食品として好適である。

【0020】次に、本発明の効果を具体的に説明する。

【0021】<1. 凍結乾燥乳酸菌菌体の調製> *Lactobacilli* MRS broth (DIFCO) に供試乳酸菌を接種し、37℃、17時間培養を行った。10000rpm、10minの遠心分離により菌体を回収し、同様の操作で蒸留水にて菌体を2回洗浄した。洗浄後、菌体を凍結乾燥し、実験に供するまで4℃で保存した。

50 【0022】<2. タウロコール酸減少試験> 各乳酸菌の凍結乾燥菌体、または、110℃、10分間加熱した凍結乾燥加熱菌の90mgをPBS (pH7.2) (Gibco

oBRL, Grand Island, NY, USA) 2 mlに懸濁し、ボルトックスミキサーで均一にした後、0.01 g/mlのタウロコール酸ナトリウム溶液100 μ lを添加し、37℃で60分間振盪培養した。振盪培養後、3000 rpm、15分間の遠心分離により上清を得た。上清を限外ろ過（モルカットII：分画分子量5,000）（日本ミリポア）した後、ろ液に残存するタウロコール酸ナトリウム量を表1に示す条件でHPLCにより測定した。胆汁酸減少率はタウロコール酸ナトリウムのみのコントロールとの比較により算出した。結果を表2に示す。

【0023】

*【表1】<HPLCの測定条件>

カラム : Shim-pack CLC-C8 (4.6 mm×25 cm) (島津製作所(株))
移動相 : 0.25 M K_2HPO_4 -HCl buffer (pH 7.5) / エタノール/メタノール=50/40/10
流速 : 0.6 ml/min
カラム温度 : 40℃
検出波長 : 210 nm
【0024】

【表2】

*

<HPLCによるタウロコール酸減少試験結果(菌体:90 mg)>

		減少率(平均±標準偏差, n=2)	
		非加熱	加熱
<u>L.acidophilus</u> group	TMC0310	44.9±4.7	28.5±1.8
	TMC0316	71.9±2.1	38.2±1.3
	TMC0330	23.0±0.4	12.1±3.5
	TMC0334	54.7±2.0	36.4±0.4
	TMC0342	20.0±2.1	6.8±0.9
	TMC0343	26.0±3.7	19.8±1.2
	TMC0351	38.2±10.7	31.8±3.0
	TMC0356	30.0±0.4	12.5±3.1
	TMC0357	79.4±1.0	32.4±2.7
	TMC0359	55.9±3.0	35.1±0.7
	TMC0362	64.5±1.1	43.2±1.2
<u>L.casei</u>	TMC0401	26.4±2.8	33.8±5.1
	TMC0402	18.6±9.5	33.6±6.4
	TMC0404	66.1±3.5	34.6±0.3
	TMC0409	27.1±3.2	35.7±2.9
	TMC0502	21.8±11.1	36.2±3.3
	TMC0703	22.6±7.6	36.5±3.1
	TMC1001	100.0±0.0	35.4±0.6
<u>L.brevis</u>	TMC4101	21.8±0.1	37.6±4.4
	TMC4103	28.2±4.4	33.8±2.4
<u>L.reuteri</u>	TMC4402	25.9±0.2	26.7±2.2
	TMC4405	100.0±0.0	40.5±4.4
	TMC4406	22.7±0.5	31.7±4.8
<u>L.salivarius</u>	TMC4501	30.1±9.1	26.6±2.3
	TMC4507	28.9±1.6	29.6±1.0

【0025】供試した全ての乳酸菌で胆汁酸の一つであるタウロコール酸の減少が認められた。生体の血清コレステロールと生体中の胆汁酸の合成および代謝には密接な関係があることが知られている。体外への胆汁酸排泄の促進は肝臓内のコレステロールから胆汁酸の変換を高め、結果的に血清コレステロールを低下させることが知られている。一方、乳酸菌にはその菌体表面に発癌物質を吸着する性質があることが知られており、それは菌体を加熱しても同様な効果があるとする報告がある。同様

に乳酸菌が胆汁酸の一つであるタウロコール酸を吸着して体外へ排泄するならば血清コレステロールを低下させることが出来ると考えられる。

【0026】今回の結果はタウロコール酸減少率が38%以上の乳酸菌群と38%未満の乳酸菌群の2群に分けることが出来た。しかしながら、減少率38%以上の乳酸菌を予め加熱して試験に供した場合にはその減少率が低下した。38%未満のものは変化しないか若干増加する傾向が認められた。これらのことから、タウロコール

酸減少率が38%未満のものはタウロコール酸を吸着したことが示唆され、38%以上のものは吸着以外の要因も考えられた。そこで以下の実験を行った。

【0027】<3. 胆汁酸代謝確認定性試験>加熱することによりタウロコール酸減少率が低下した*Lactobacillus reuteri* TMC 4405と加熱することによりタウロコール酸減少率が若干増加した*Lactobacillus casei* TMC 0409を使用して定性試験を行った。凍結乾燥菌体90mgを使用してタウロコール酸減少試験を上記と同様に実施し、その際に得られたる液をBond Elute (C18, 200mg) (varian) にて前処理した後、HPLC胆汁酸分析システム(日本分光)により分析した。

【0028】図1(a)~(c)にHPLCのクロマトグラムを示した。図1(a)はコントロール、図1(b)は*Lactobacillus reuteri* TMC 4405を使用した場合、図1(c)は*Lactobacillus casei* TMC 0409を使用した場合であり、ピーク(1)は未知物質、ピーク(2)はタウロコール酸、ピーク(3)はコール酸である。

【0029】*Lactobacillus reuteri* TMC 4405を使用した場合、添加したタウロコール酸が消失し、若干のコール酸が産生されたが、大部分は溶出時間8.8分の未知の物質が産生された。このHPLC胆汁酸分析システムは胆汁酸を3 α -HSD酵素反応で検出するため、ピーク(1)の未知物質は胆汁酸代謝物(二次胆汁酸)と考えることが出来る。

【0030】二次胆汁酸の一つであるデオキシコール酸は発癌との関係が示唆されている。従って、上記の本未知物質も注意を要する。また、若干産生されたコール酸も腸内で腸内細菌により代謝され二次胆汁酸が産生されることが知られている。一方、*Lactobacillus casei* TMC 0409を添加した場合、タウロコール酸以外のピークは認められなかった。よって、*Lactobacillus casei* TMC 0409は二次胆汁酸非生成であることが明らかとなった。

【0031】以上の結果、二次胆汁酸非生成であり且つ胆汁酸の一つであるタウロコール酸を吸着することが認められた*Lactobacillus casei* TMC 0409が腸内で増殖すれば血清コレステロール低下効果が期待できる。

【0032】発酵乳製造用の乳酸菌には*Lactobacillus bulgaricus*の様に胃酸耐性および胆汁酸耐性の低いものが一般に使用されており、このような乳酸菌は腸内では増殖できない。腸内で乳酸菌が増殖するためには胃酸耐性および胆汁酸耐性があることが不可欠である。そこで、次に、*Lactobacillus casei* TMC 0409の胃酸耐性および胆汁酸耐性を調査した。また、腸内で効果的に増殖するには乳酸菌が腸壁に付着することが望ましい。よって、腸細胞付着性も併せて調査した。

【0033】<4. 人工胃液および人工胆汁液の調製と耐性試験>乳酸菌には高梨乳業(株)商品研究所保存菌

株である*Lactobacillus acidophilus* TMC 0330、*Lactobacillus acidophilus* TMC 0343、*Lactobacillus casei* TMC 0401、*Lactobacillus casei* TMC 0409を使用した。人工胃液は、MR S brothに6N塩酸を加えてpH2に調整し、121℃、15分間加熱後に無菌的にペプシン(Sigma)溶液を0.005%となる様に添加して調製した。人工胆汁液は、MR S brothに0.3%となる様にOxgall(Difco)を添加し、121℃15分間オートクレーブ処理して調製した。

【0034】人工胃液耐性試験においては、18時間培養した乳酸菌のMR S培養液を人工胃液に1%接種し、37℃で4時間培養した後、BCP加プレートカウント寒天培地(栄研化学)により生菌数の変化を測定し、耐性率を算出した。人工胆汁液耐性試験においても同様に供試乳酸菌のMR S培養液を人工胆汁液に5%接種し、37℃10時間培養後、分光光度計(PV-5000、島津製作所)により濁度(O.D. 660)を測定し、胆汁酸無添加のコントロールと比較して耐性率を算出した。

【0035】図2に人工胃液耐性試験の結果を示した。図2中、-●-は*Lactobacillus acidophilus* TMC 0330、-■-は*Lactobacillus acidophilus* TMC 0343、-▲-は*Lactobacillus casei* TMC 0401、-▼-は*Lactobacillus casei* TMC 0409を表す。

【0036】*Lactobacillus acidophilus* TMC 0330、*Lactobacillus acidophilus* TMC 0343、*Lactobacillus casei* TMC 0401は培養4時間で生菌数が0になったのに対して*Lactobacillus casei* TMC 0409は生菌数が4(log cfu)/mlであり、人工胃液耐性が認められた。

【0037】胆汁酸耐性試験の結果を表3に示した。いずれの菌株も人工胆汁液に対して耐性を示したが、その中でも*Lactobacillus casei* TMC 0409には最も高い耐性(70.9%)が認められた。

【0038】

【表3】

<胆汁酸耐性試験結果>

菌 株	胆汁酸耐性 (%)
<i>L. acidophilus</i> TMC 0330	54.2
<i>L. acidophilus</i> TMC 0343	57.0
<i>L. casei</i> TMC 0401	49.7
<i>L. casei</i> TMC 0409	70.9

【0039】表3中、胆汁酸耐性は、胆汁酸含有MR S培地(X)と胆汁酸非含有MR S培地(Y)でそれぞれ37℃で4時間培養した際の吸光度の比較を表し、(%)は(X/Y)×100の値を意味する。

【0040】<5. 腸細胞付着性試験>

(5-1. 細胞培養) 腸細胞の代表例であるCaco-2

細胞は、理化学研究所・細胞開発銀行から購入した。培地には10%非働化牛胎児血清および非必須アミノ酸2%ペニシリン・ストレプトマイシン溶液(5,000IU/ml)(共にGibcoBRL)を添加したダルベッコの改変Eagle培地(GibcoBRL)を使用した。細胞は25cm²培養フラスコで10%CO₂存在下、37℃のインキュベーター内で培養し、継代維持した。

【0041】(5-2. 付着性試験)乳酸菌のCaco-2細胞に対する付着性試験は、Darfeuille-Michaudら(Infection and Immunity, 58:893-902, 1990)のE.coliのCaco-2細胞への付着性試験を部分的に変更して実施した。すなわち、付着性試験のためにCaco-2細胞を8-well Lab-Tek chamber slide(Nunc Inc.)に接種し(1.4×10⁴cells/cm²)、1日置きに培地交換をして約15日間培養した。細胞はPBS(pH7.2)(GibcoBRL)で2回洗浄した後、乳酸菌懸濁液(1×10⁸cells/ml PBS)を300μl添加した。10%CO₂存在下、37℃で2時間反応させた。反応後、細胞はPBSで3回洗浄し、メタノールで固定した後、ギムザ液で染色した。付着性は光学顕微鏡により20視野を観察し、100細胞当たり付着した乳酸菌の数として表した。

【0042】(5-3. 結果)結果を表4に示した。Lactobacillus casei TMC0409は他の菌と比較してCaco-2細胞に高い付着性を示した。Caco-2細胞は腸のモデル細胞として広く利用されている。Lactobacillus*
<Str.thermophilus 発酵乳の粘度測定>

	粘度(cP)
酸脱脂乳(pH4.5)	250
Str.thermophilus TMC1502	2700
Str.thermophilus TMC1504	2600
Str.thermophilus TMC1505	4350
Str.thermophilus TMC1510	2850
Str.thermophilus TMC1511	4400
Str.thermophilus TMC1512	3300
Str.thermophilus TMC1520	3000
Str.thermophilus TMC1521	3800
Str.thermophilus TMC1522	4600
Str.thermophilus TMC1526	4800
Str.thermophilus TMC1534	4200
Str.thermophilus TMC1535	4100
Str.thermophilus TMC1536	3900
Str.thermophilus TMC1538	3500
Str.thermophilus TMC1540	3100
Str.thermophilus TMC1543	5400

【0047】表5に示す様に、Str. thermophilus TMC1543発酵乳が最も高い粘度を示した。逆に、Str. thermophilus TMC1502発酵乳およびStr. thermophilus TMC1504発酵乳の粘度はその約1/2であった。また、酸脱脂乳の粘度は極めて低いものであった。

【0048】<7. Streptococcus thermophilus 発

*s. casei TMC0409は、胃酸、胆汁酸に対して抵抗性を示しながら、ヒト腸上皮上に付着して顕著に増殖すると思われ、効率的なコレステロール低下効果が期待できる。

【0043】

【表4】

<Caco-2細胞への乳酸菌の付着性>

菌 株	付着性
L.acidophilus TMC0330	(-)
L.acidophilus TMC0343	(+)
L.casei TMC0401	(-)
L.casei TMC0409	(++)

【0044】表4中、付着性は、無作為に20視野を観察し、100細胞当たり付着した乳酸菌数を顕微鏡下で計測し、(-):菌数0~20、(+):21~50、(++) :51~100で表した。

【0045】<6. Streptococcus thermophilus 発酵乳の粘度測定試験>16株のStr. thermophilus16株でそれぞれ発酵乳を調製してカードを破壊後、B型粘度計(東京計器(株))で粘度を測定した。結果を表5に示した。

【0046】

【表5】

酵乳のコレステロール吸着性試験>粘度が最も高かったStr. thermophilus TMC1543発酵乳と、粘度が低かったStr. thermophilus TMC1502発酵乳およびStr. thermophilus TMC1504発酵乳をそれぞれ凍結乾燥した。また、乳酸でpH4.5に調整した酸脱脂乳も同様に凍結乾燥した。これらの凍結乾燥物をコレステロール

溶液(100 μ g/ml(60%エタノール))に懸濁し、37℃で1時間振盪した。遠心分離後、上清液を限外ろ過(分画分子量5000)し、ろ液のコレステロール量を測定し比較した。

【0049】図3(a)及び(b)に上記の結果を示した。図3中、(1)は酸脱脂乳、(2)はStr. thermophilus TMC1502発酵乳、(3)はStr. thermophilus TMC1504発酵乳、(4)はStr. thermophilus TMC1543発酵乳の結果を表す。数値は平均値 \pm 標準偏差(n=3)で表した。酸脱脂乳と比較して有意差がある(P<0.05)と判断される。

【0050】酸脱脂乳と発酵乳の間で遠心分離後の上清中のコレステロール量に有意な差は認められなかった。しかしながら、上清液をさらに限外ろ過した場合、そのろ液中のコレステロール量に変化が認められた。その中で、Str. thermophilus TMC1543発酵乳は安定してコレステロール量を低下させており、酸脱脂乳と比較して有意差が認められた(P<0.05)。

【0051】以上の結果から、Str. thermophilus TMC1543発酵乳の遠心分離した上清中に溶解する分子量5000以上の物質がコレステロールを安定して吸着することが示唆された。従って、Str. thermophilus TMC1543発酵乳を飲用することによりコレステロールの

吸収抑制が期待される。

【0052】<8. 発酵乳の血清脂質改善効果に関する動物実験>

(8-1. 発酵乳の調製) 発酵乳(90℃殺菌後、Lactobacillus casei TMC0409及び/又はStr. thermophilus TMC1543で発酵)の培養基の成分を表6に示した。この際のLactobacillus casei TMC0409とStr. thermophilus TMC1543の両菌で発酵させた発酵乳の乳酸菌数は、Lactobacillus casei TMC0409が1.0 \times 10⁹/ml、Str. thermophilus TMC1543が5.0 \times 10⁷/mlであった。Lactobacillus casei TMC0409のみで発酵させた発酵乳の乳酸菌数は、Lactobacillus casei TMC0409が2.0 \times 10⁹/mlであった。Str. thermophilus TMC1543のみで発酵させた発酵乳の乳酸菌数は、Str. thermophilus TMC1543が5.0 \times 10⁹/mlであった。何れの発酵乳も乳蛋白質量は52.68g、乳清蛋白質量は19.91gであり、乳蛋白質中に占める乳清蛋白質の割合は37.8%であり、本請求項の範囲内であった。

【0053】

【表6】

<発酵乳の培養基成分(動物実験)>

脱脂粉乳	122g
ホエータンパク質濃縮物(WPC)	14g
(蛋白質含有量80重量%、AMPC,Inc.USA)	4g
大豆ペプチド	10g
ショ糖	10g
果糖	10g
水	840ml

【0054】(8-2. 動物実験) 動物実験には、4週齢のSD系雄ラット(日本クレア(株))を使用した。市販の固形飼料(MF:オリエンタル酵母工業)を与えて1週間予備飼育し、平均体重がほぼ等しくなる様に群分けした後、直ちに表7に示したコントロール食およびカゼインの一部をWPC添加発酵乳またはWPC添加非発酵乳の凍結乾燥物に置換した飼料にて飼育を行った。また、5群の飼料の蛋白質含量は等しくなる様にした。水および実験食は自由摂取とした。14日後に尾静脈より採血を行い、血清中の脂質分析を実施した。血清中の総

コレステロールはコレステロールE-テストワコー(和光純薬工業)、トリグリセライドはトリグリセライドGテストワコー(和光純薬工業)、HDL-コレステロールはHDL-コレステロールE-テストワコー(和光純薬工業)、リン脂質はリン脂質Cテストワコー(和光純薬工業)を使用して測定した。なお、採血は一晩絶食させた後に実施した。

【0055】

【表7】

<飼料組成>

	Diets (%)				
	control群	WPC非 発酵物群	0409WPC 発酵乳群	1543WPC 発酵乳群	0409-1543WPC 発酵乳群
カゼイン	20.0	12.0	12.0	12.0	12.0
WPC非発酵物	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0
0409WPC 発酵乳	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0
1543WPC 発酵乳	0.0	0.0	0.0	20.0	0.0
0409-1543 WPC発酵乳	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0
Lard	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
Corn oil	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ビタミン混合 ⁽¹⁾	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
ミネラル混合 ⁽²⁾	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
塩化コリン	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
セルロース	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
コレステロール	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
コル酸ナトリウム	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
スクロース	62.375	50.375	50.375	50.375	50.375
Total	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000

(1), (2) : AIN-76

【0056】(8-3. 結果) 図4に血清総コレステロールの測定結果を示した。図4中、(1)はコントロール群、(2)はWPC非発酵物群、(3)は0409WPC発酵乳群、(4)は1543WPC発酵乳群、(5)は0409-1543WPC発酵乳群の結果である。

【0057】総コレステロール値は、コントロール群と比較し、*Lactobacillus casei* TMC 0409のみで発酵させた0409WPC発酵乳群と*Str. thermophilus* TMC 1543のみで発酵させた1543WPC発酵乳群で低下する傾向が見られたものの有意差は認められなかった。

【0058】しかしながら、*Lactobacillus casei* TMC 0409と*Str. thermophilus* TMC 1543の両菌で発酵

させた発酵乳(0409-1543WPC発酵乳)に顕著なコレステロール低下効果が認められ、それは統計的に有意であった($P < 0.05$)。このことは、コレステロール低下効果があるとされる乳清蛋白質と*Lactobacillus casei* TMC 0409の発酵物(乳酸菌菌体を含む)と*Str. thermophilus* TMC 1543発酵物(乳酸菌菌体を含む)の相乗効果と考えられた。また、その他の血清脂質の測定結果を表8に示した。コントロール群と比較して0409-1543WPC発酵乳群でHDL-コレステロールの増加とトリグリセリドの減少が観察された。

【0059】

【表8】

<その他の血清脂質の測定結果>

	control群	WPC非 発酵物群	0409WPC 発酵乳群	1543WPC 発酵乳群	0409-1543 WPC発酵乳群
HDL -コレステロール	18.3±1.7	15.4±1.2	16.6±1.3	19.0±1.5	23.6±2.2
トリグリセリド	159.7±18.1	88.7±3.9*	129.9±16.6	140.4±10.0	128.0±14.3
リン脂質	126.5±5.8	124.6±6.2	127.2±24.8	133.3±4.6	124.2±14.8

(*:危険率1%以下で有意差あり)

【0060】<9. 発酵乳の血清脂質改善効果に関するヒト生体試験>

(9-1. 発酵乳の調製) 発酵乳の培養基の成分を表9に示した。この際の発酵乳の乳酸菌数は、*Lactobacillus casei* TMC0409が 6.1×10^8 /ml、*Str. thermophilus* TMC1543が 2.6×10^7 /mlであった。この際の乳蛋白質量は40.18g、乳清蛋白質量は22.405g、乳蛋白質中に占める乳清蛋白質の割合は55.8%であり、本請求項の範囲内であった。

20

【0061】

【表9】

<発酵乳の培養基成分>

成 分	(g)
脱脂粉乳	66.3
ホエイ蛋白質濃縮物 (蛋白質含有量80重量%) (AMPC, Inc. USA)	22.1
大豆ペプチド	2.6
ショ糖	6.5
果糖	6.5
甘味料	10.2
香料	0.9
水	884.9

【0062】(9-2. 偽薬(プラセボ)の調製) 被験者の心理的影響を考慮するため、コレステロール低下作用の有効成分と考えられる物質を含まない発酵乳類似物質である偽薬(プラセボ)を調製した。その成分を表10に示した。

【0063】

【表10】

<偽薬(プラセボ)の成分>

成 分	(g)
脱脂粉乳	66.3
カゼインNa (蛋白質含有量92.5重量%)	19.6
大豆ペプチド	2.6
ショ糖	6.5
果糖	6.5
甘味料	10.2
香料	0.9
水	687

(混合殺菌後に乳酸溶液200mlを添加した)

【0064】(9-3. 被験者) 事前の問診、既往歴などで試験参加に相当であると判断された、健康な成人男性を対象とした。そして、試験の目的、方法、予想される副作用などについて十分な説明を行い、試験参加に同意した者の中から、血清総コレステロール値の比較的高い人(200mg/dl以上)を含む20名を被験者として選出した。

30

【0065】(9-4. 発酵乳の飲用) 被験者20名を無作為に2群に分け、発酵乳飲用群(10人)、偽薬(プラセボ)飲用群(10人)とした。被験者にはどちらの群に属するかを知らせない様にした。飲用期間は8週間とした。飲用期間中、毎日、表9に記載の発酵乳、または、表10に記載の偽薬(プラセボ)を1回200ml毎で朝夕2回(1日合計400ml)飲用させた。

40

【0066】(9-5. 採血と血液分析) 採血は、試験飲料飲用直前、飲用開始4週間後、飲用開始8週間後の朝に産業医が実施した。また、同時に問診も行い、血圧も測定した。採取した血液の分析は保健科学研究所(横浜)にて実施した。

【0067】(9-6. 結果) 図5(a)及び(b)に総コレステロールの測定結果を示した。図5(a)は偽薬(プラセボ)群、図5(b)は発酵乳群である。図5中、-●-は被験者全体(n=10)、-□-は200mg/dl以上の被験者(n=7)、-△-は200mg/dl未満の被験者(n=3)を表す。

50

【0068】飲用開始前の測定値が200mg/dl以上の高めの人と200mg/dl未満の人に区分した結果も示した。偽薬（プラセボ）群の場合、被験者全体では僅かな総コレステロール値の上昇傾向を示した。200mg/dl以上の高めの被験者は変化を示さなかった。一方、200mg/dl未満の被験者は顕著な上昇を示した。発酵乳群では、被験者全体では総コレステロール値の低下傾向を示した。200mg/dl以上の高めの被験者もコレステロール値の低下を示した。200mg/dl未満の被験者は変化を示さなかった。

【0069】図6にHDL-コレステロールの測定結果を示した。図6中、-○-は偽薬（プラセボ）群、-●-は発酵乳群である。

【0070】発酵乳群は飲用開始4週間でHDL-コレステロール値の上昇を示した（0週と比較して危険率5%で統計学的に有意差を示した）。飲用開始8週間では発酵乳群はさらに上昇した（危険率1%で統計学的に有意差を示した）。一方、プラセボ群は4週間では変化を示さなかった。8週間でプラセボ群は危険率5%で有意な上昇を初めて示した。

【0071】図7にトリグリセライドの測定結果を示した。図7中、-○-は偽薬（プラセボ）群、-●-は発酵乳群である。

【0072】偽薬（プラセボ）群の場合、被験者全体では僅かなトリグリセライド値の上昇傾向を示した。発酵乳群では、トリグリセライド値の低下を示した。

【0073】以上の結果から、供試発酵乳の飲用により、総コレステロール値の低下、HDL-コレステロールの上昇、トリグリセライドの低下を伴う血清脂質改善効果が人においても認められることが明らかとなった。

【0074】また、図8に血圧の変化の測定結果を示した。図8中、-○-は偽薬（プラセボ）群、-●-は発酵乳群である。

【0075】図8から発酵乳の飲用によって意外にも最高血圧が統計学的に有意に低下することが明らかである（0週と比較して危険率5%で統計学的に有意差を示した）。一方、偽薬（プラセボ）群の場合はそのような傾向は示さなかった。血清脂質の改善と血圧を低下させることは生活習慣病（成人病）予防にとって重要であり、本発明発酵乳はその予防にとって有効であることが示唆されている。

【0076】

【実施例】次に、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明は、その要旨を超えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。なお、「%」は「重量%」を意味する。

【0077】実施例1

脱脂粉乳（高梨乳業（株）、蛋白質含量34%）6.63kg、市販の乳清蛋白質濃縮物（AMPC, Inc. U. S. A. 蛋白質含量80%）2.21kg、市販の大豆ベ

ブチド（不二製油（株））0.26kg、砂糖2.65kg、果糖2.65kg、香料（協和香料興産（株））100gを温水90.0kgに溶解し、均質化し、90℃で瞬時殺菌し、発酵乳ミックス（培養基）を調製した。ラクトバチルス・カゼイTMC0409株とストレプトコッカス・サーモフィラスTMC1543を上記発酵乳ミックス（培養基）に接種し、34℃で24時間発酵させ、冷却して発酵乳100kgを得た。この発酵乳の乳蛋白質量は4.022kg、乳清蛋白質量は2.241kgであり、乳蛋白質中の乳清蛋白質の割合は55.7%であった。

【0078】実施例2

実施例1で調製した発酵乳100kgを凍結真空乾燥して粉末13kgを得た。これを100gずつガラス瓶に充填し、粉末食品125個を得た。この粉末食品は実施例1と同様で、乳蛋白質中の乳清蛋白質の割合は55.7%であった。また、ラクトバチルス・カゼイTMC0409株とストレプトコッカス・サーモフィラスTMC1543は生菌として粉末1gあたり4×10⁸個、4×10⁷個それぞれ検出された。

【0079】実施例3

下記の通りにサワークリームを調製した。すなわち、生クリーム（乳脂肪47%）87kg、脱脂粉乳（高梨乳業（株）、蛋白質含量34%）3.5kg、乳清蛋白質濃縮物（AMPC, Inc. U. S. A. 蛋白質含量80%）7.0kg、ヘキサメタリン酸ナトリウム（三栄源エフエフアイ（株））80g、水10.0kgを加温溶解し、均質化した。次いで、120℃で4秒間殺菌し、冷却した後、ラクトバチルス・カゼイTMC0409株とストレプトコッカス・サーモフィラスTMC1543を添加し、37℃で24時間培養した。そして、カードを破壊後、容器に充填した。このサワークリームの乳蛋白質中の乳清蛋白質の割合は74.9%であった。

【0080】実施例4

下記の通りにクリームチーズ類を調製した。すなわち、クリームチーズ（（株）グローバルワーク）10kg、実施例2の粉末1.2kgの割合で良く混合し、冷却した。

【0081】実施例5

下記の通りにバター類を調製した。すなわち、乳脂肪76.0%、食塩1.1%、実施例2の粉末3.2%の割合で常法により製造した。

【0082】

【発明の効果】以上説明した本発明によれば、血清中の総コレステロールの低減とHDL-コレステロールの増加およびトリグリセライドの低減を図った機能性飲食品であって、乳清蛋白質を含有し且つ他の成分により乳清蛋白質の効果を高めることにより、乳清蛋白質の適用量を軽減し得る様に改善された上記の機能性飲食品が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】乳酸菌の胆汁酸代謝確認定性試験で得たHPLCのクロマトグラム

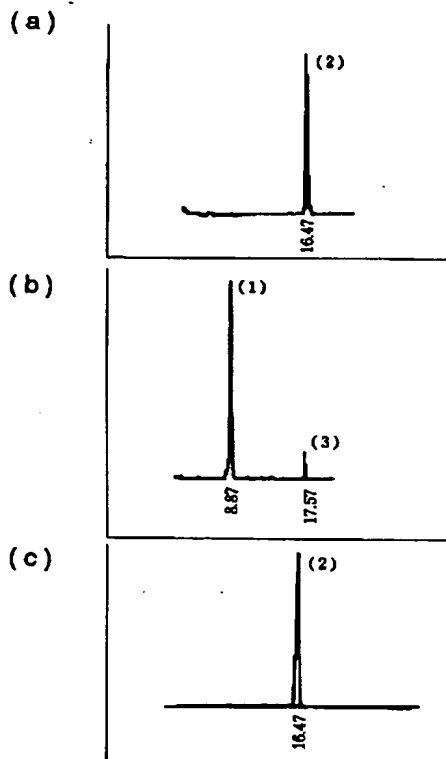
【図2】乳酸菌の人工胃液耐性試験の結果のグラフ

【図3】発酵乳のコレステロール吸着性試験の結果の説明図

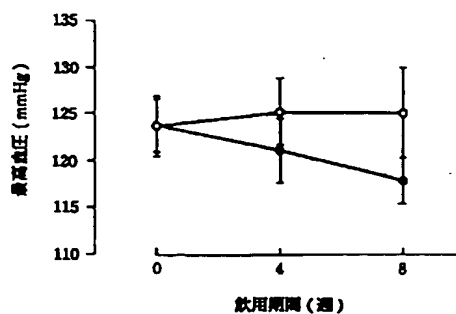
【図4】発酵乳の血清脂質改善効果に関する動物実験の結果（血清総コレステロール測定結果）の説明図

【図5】発酵乳の血清脂質改善効果に関するヒト生体試*

【図1】



【図8】



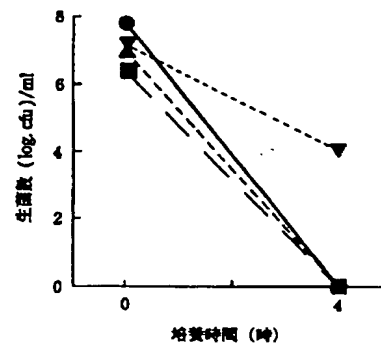
* 験の結果（血清総コレステロール測定結果）の説明図

【図6】発酵乳の血清脂質改善効果に関するヒト生体試験の結果（HDL-コレステロールの測定結果）の説明図

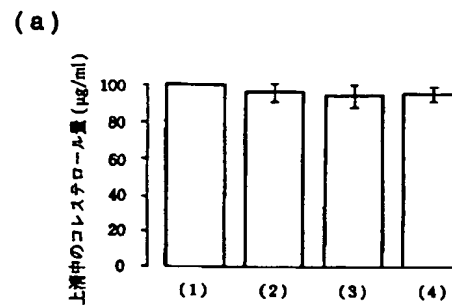
【図7】発酵乳の血清脂質改善効果に関するヒト生体試験の結果（トリグリセライドの測定結果）の説明図

【図8】発酵乳の血清脂質改善効果に関するヒト生体試験の結果（血圧の変化の測定結果）の説明図

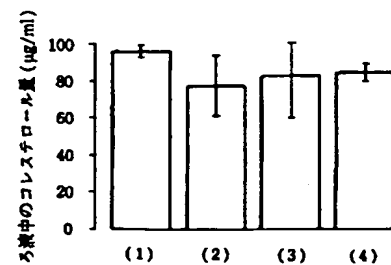
【図2】



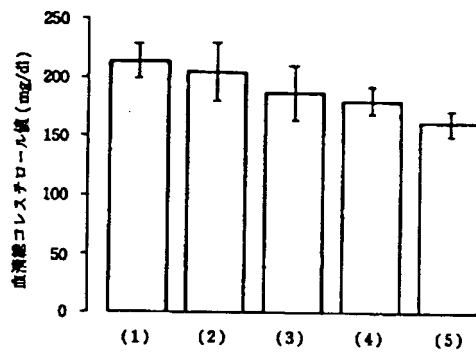
【図3】



(b)

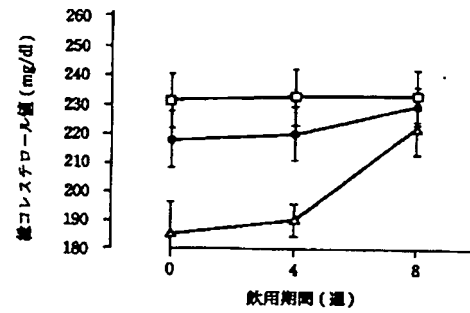


【図4】

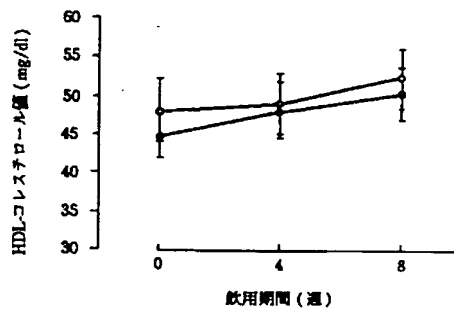


【図5】

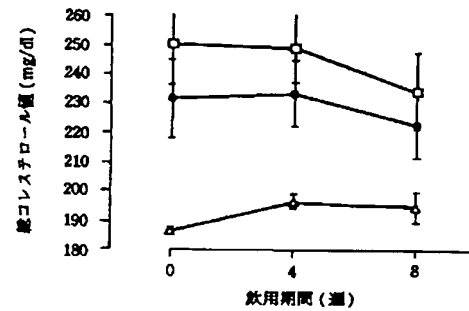
(a)



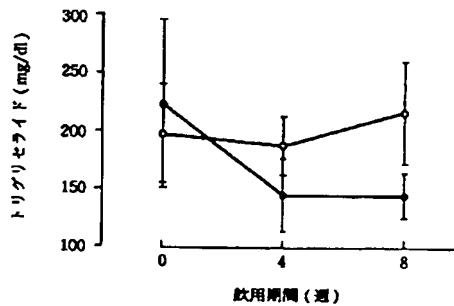
【図6】



(b)



【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

C12N 1/20

識別記号

FI

C12N 1/20

テーマコード (参考)

A
E

F ターム(参考) 4B001 AC31 BC04 DC01 EC05
4B018 LB07 LE03 LE04 MD86 ME04
MF06 MF13
4B065 AA01X AA30X BD10 CA42
4C087 AA01 AA02 BB39 BC56 BC57
BC61 CA10 CA16 MA02 MA52
NA05 NA14 ZC33

THIS PAGE BLANK (USPTO)